

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-72481

(43)公開日 平成5年(1993)3月26日

(51)Int.Cl.⁵
G 0 2 B 21/00
G 0 1 N 21/64

識別記号 庁内整理番号
7246-2K
Z 9115-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 5(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平3-260488

(71)出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(22)出願日 平成3年(1991)9月12日

(72)発明者 熊谷 悟

東京都品川区西大井1丁目6番3号 株式

会社ニコン大井製作所内

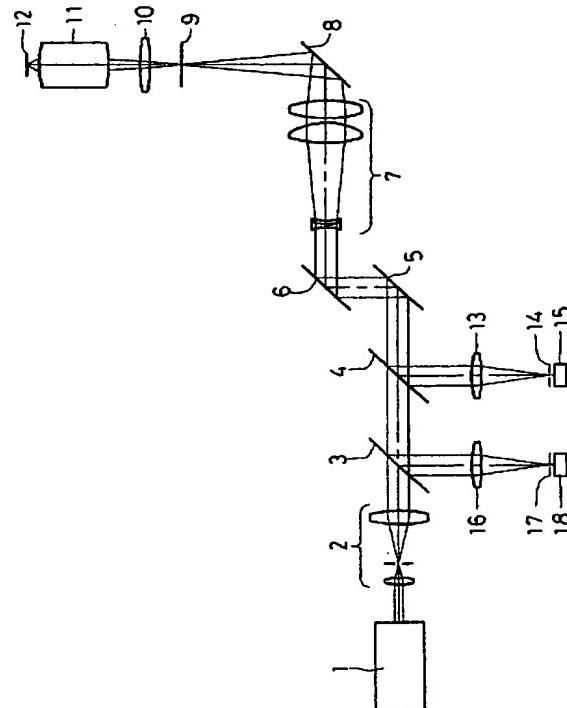
(74)代理人 弁理士 佐藤 正年 (外1名)

(54)【発明の名称】 蛍光コンフォーカル顕微鏡

(57)【要約】

【目的】 広い視野に渡って、優れた光学的切断機能と良好な横方向分解能が得られるとともに、定量測定の精度を向上させることのできる蛍光コンフォーカル顕微鏡を提供する。

【構成】 スキャナミラー5, 6と対物光学系(瞳投影レンズ10, 対物レンズ11)の間のスキャナ光学系7は、レトロフォーカスタイルの構成をなし、励起波長及び蛍光波長での対物光学系の倍率色収差を打ち消すような倍率色収差をもつ。対物レンズ11の瞳は、瞳投影レンズ10とスキャナ光学系7によって、スキャナミラー5, 6の近傍にリレーされる。このときの瞳倍率 β は、 $|\beta| \leq 1$ とする。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 励起光を試料上に集光する対物光学系と、前記励起光で前記試料表面を走査するための走査手段と、該走査手段と前記対物光学系の間に配置された走査光学系とを有し、前記試料から発せられ、前記対物光学系及び前記走査光学系を通過した蛍光を検出する蛍光コンフォーカル顕微鏡において、前記走査光学系を含む中間光学系が、前記対物光学系の前記励起波長及び前記蛍光波長における倍率色収差を補正するように構成されたことを特徴とする蛍光コンフォーカル顕微鏡。

【請求項2】 前記走査光学系が、前記走査手段側から負レンズ群及び正レンズ群からなるレトロフォーカスタイルの構成をなすことを特徴とする請求項1の蛍光コンフォーカル顕微鏡。

【請求項3】 前記対物光学系が対物レンズと瞳投影レンズとを有し、該瞳投影レンズと前記走査光学系によって、前記対物レンズの瞳が前記走査手段近傍にリレーされ、かつ瞳倍率 β が下式を満たすことを特徴とする請求項2の蛍光コンフォーカル顕微鏡。

$$| \beta | < 1$$

【請求項4】 前記中間光学系が前記対物光学系による前記試料の像をリレーするリレー光学系を含むことを特徴とする請求項1の蛍光コンフォーカル顕微鏡。

【請求項5】 前記対物光学系が対物レンズと瞳投影レンズとを有し、前記対物レンズの瞳が前記走査手段近傍にリレーされ、かつ、前記リレー光学系の結像倍率 β が下式を満たすことを特徴とする請求項4の蛍光コンフォーカル顕微鏡。

$f_1 \cdot f_0 \cdot NA / (f_1 + r_0) \leq | \beta | < 1$
但し、 f_1 は走査光学系の焦点距離、 f_0 は対物レンズの焦点距離、NAは対物レンズの開口数、 f_1 は瞳投影レンズの焦点距離、 r_0 は瞳結像面における走査手段有効半径。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、励起光で試料面を走査し、試料から発せられた蛍光をピンホール上に集光してピンホールを通過した蛍光を検出することにより、合焦情報だけを選別して得るようにした蛍光コンフォーカル顕微鏡に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来の蛍光コンフォーカル顕微鏡においては、その対物レンズとして、肉眼あるいはテレビカメラによる通常の観察用に倍率色収差が補正された顕微鏡対物レンズが使用されていた。

【0003】 従来の顕微鏡対物レンズ単体、または、コンペニセーション方式では顕微鏡対物レンズと接眼レンズの合成系では、特定の2波長（例えばF線（青）とC線（赤））について倍率色収差が補正されているが、他

の波長については倍率色収差の2次スペクトルがあつた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、上記のような従来の蛍光コンフォーカル顕微鏡においては、多くの場合そうであるように、励起光の波長と蛍光の波長が対物レンズの倍率色収差補正の対象となっている特定の波長と一致していないと、励起波長と蛍光波長で倍率色収差が現われることになる。

【0005】 この倍率色収差は、通常の蛍光顕微鏡においては、単に蛍光像の倍率が変わるだけであるから、それ程問題にはならない。しかし、蛍光コンフォーカル顕微鏡においては、励起光波長と蛍光波長で倍率色収差があると、蛍光スポットの中心がピンホールの中心からずれるため、ピンホールを通過する光量が減少して像が暗くなる。

【0006】 一般に、視野の外側に行く程倍率色収差は大きくなるので、物体（試料）が視野の中心と周辺部で同量の蛍光を発していたとしても、蛍光コンフォーカル顕微鏡による画像では、視野の周辺部の像は視野の中心の像より暗くなってしまう。

【0007】 特に、蛍光コンフォーカル顕微鏡の特徴である、光学的切断機能と良好な横方向分解能を得るためにピンホールの径を小さくすると、視野周辺での光量の減少が甚だしくなって実質的に視野の中心付近しか観察できず、通常の顕微鏡より視野が狭くなってしまうという問題が生じる。

【0008】 また、蛍光スポット中心とピンホール中心がずれると、試料の光軸方向の移動に対する検出光量の

30 応答の形が変化して、得られた画像の信頼性が落ちてしまう。

【0009】 更に、励起光1波長、蛍光2波長の蛍光試薬（indo-1）や励起光2波長、蛍光1波長の蛍光試薬（Fura-2）等を使用して、1つの波長の励起光に対する2つの異なる波長の蛍光の光量の比較、あるいは2つの異なる波長の励起光に対する1つの波長の蛍光の光量の比較によってイオン等の定量測定を行なう場合、2つの励起波長又は蛍光波長で倍率色収差の大きさが異なると、視野の周辺に行くに従って、2つの異なる励起波長又は蛍光波長間で光量の減少の仕方が違つてくるため、測定の定量性がなくなるという問題があった。

【0010】 この発明は、かかる点に鑑みてなされたものであり、励起波長と蛍光波長での倍率色収差を低減させることにより、広い視野にわたって優れた光学的切断機能と良好な横方向分解能を得ることができ、また、複数の励起波長又は蛍光波長を扱う定量測定の精度向上させることができる蛍光コンフォーカル顕微鏡を提供することを目的とするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】 本発明の蛍光コンフォー

カル顕微鏡は、励起光を試料上に集光する対物光学系と、前記励起光で前記試料表面を走査するための走査手段（実施例におけるスキャナミラー）と、該走査手段と前記対物光学系の間に配置された走査光学系（実施例におけるスキャナ光学系）とを有し、前記試料から発せられ、前記対物光学系及び前記走査光学系を通過した蛍光を検出する顕微鏡であり、上記の課題を達成するためには、前記走査光学系を含む中間光学系が、前記対物光学系の前記励起波長及び前記蛍光波長における倍率色収差を補正するように構成されたものである。

【0012】本発明において、対物光学系の倍率色収差を走査光学系によって補正する場合には、前記走査手段側から負レンズ群及び正レンズ群からなるレトロフォーカスタイルとするとともに、前記対物光学系の瞳投影レンズと前記走査光学系によって、前記対物レンズの瞳が前記走査手段近傍にリレーされ、かつ瞳倍率 β が下式を満たす構成をとることが望ましい。

$$|\beta| < 1$$

【0013】また、対物光学系の倍率色収差を、試料の像をリレーするリレー光学系で補正する場合には、対物レンズの瞳が走査手段近傍にリレーされ、かつ、前記リレー光学系の結像倍率 β が下式を満たす構成とすることが望ましい。

$$f_{\text{t}} \cdot f_{\text{o}} \cdot NA / (f_{\text{t}} \cdot r_{\text{t}}) \leq |\beta| < 1$$

但し、 f_{t} は走査光学系の焦点距離、 f_{o} は対物レンズの焦点距離、NAは対物レンズの開口数、 r_{t} は瞳投影レンズの焦点距離、 r_{t} は瞳結像面における走査手段有効半径。

【0014】

【作用】蛍光コンフォーカル顕微鏡で、励起光として使用される光はレーザ光等の波長の短い光であり、検出すべき蛍光は励起光に比べて波長の長い光である。従つて、この種の顕微鏡では、大きく異なる2つの波長についての倍率色収差を補正する必要がある。しかし、従来用いられている顕微鏡対物レンズは、補正波長以外のこのような広い波長帯域についての倍率色収差については考慮されておらず、また、仮に収差補正しようとしても対物光学系だけで広帯域の補正を行なうことは困難である。

【0015】そこで、本発明では、対物光学系と走査手段の間に設けられる中間光学系を、対物光学系の励起波長及び蛍光波長での倍率色収差を打ち消すように構成することによって、対物光学系と中間光学系の合成系全体としての倍率色収差を低減している。

【0016】これにより、対物光学系の倍率色収差に起因する蛍光スポット中心とピンホール中心のずれが小さくなり、本来ピンホールを通過すべき合焦点からの蛍光が損失するという問題が解消される。

【0017】また、複数の励起波長に対するそれぞれの蛍光光量を比較したり、单一波長の励起光によって発光

する複数波長の蛍光の光量を比較したりする場合、本発明では蛍光に対する励起光同志又は励起光に対する蛍光同志の倍率色収差の差がほとんどないため、正確な定量測定を行なうことが可能である。

【0018】

【実施例】以下、図面を参照して本発明の実施例を説明する。まず、図1は本発明第1実施例による蛍光コンフォーカル顕微鏡の要部の構成を示す光路図である。本実施例では、励起光1波長、蛍光2波長の蛍光波長により10 試料を染色して観察する場合の光学系において、スキャナ光学系で対物光学系の倍率色収差を補正する例について説明する。

【0019】図において、レーザ光源1から射出された励起光は、ビームエクスパンダ2によってスキャナミラー5、6に見合った適当な径に拡大されて平行ビームとなり、ダイクロイックミラー3、4を透過してスキャナミラー5、6（走査手段）に入射する。このスキャナミラー5、6は、回転方向が互いに直交するように構成されており、ミラー5の回転軸が紙面内面にあればミラー6の回転軸は紙面と垂直な方向にある。スキャナミラー5、6より射出された励起光はスキャナ光学系7（詳細後述）に入射し、ミラー8で折り曲げられて1次像面9上にスポットを結ぶ。前述のスキャナミラー5、6を振ることにより、1次像面でレーザスポットが2次元移動する。なお、スキャナ光学系7の後のミラー8は、光学系を倒立型の配置にするためのものであり、他の配置をとる場合には省略することも可能である。

【0020】次に、1次像面9で一旦集光した励起光は、瞳投影レンズ10、対物レンズ11を経て、試料面30 12上に再度スポットを結ぶ。試料面12上では、1次像面と同様に、スキャナミラー5、6の振動と同期してスポットが移動し、2次元走査がなされる。本実施例では、瞳投影レンズ10と対物レンズ11によって対物光学系を構成しているが、瞳投影レンズ10は、スキャナ光学系7と組み合わされて対物レンズ11の瞳をスキャナミラー5、6の近傍（ミラー5、6の中間）に投影するため配置されているものである。

【0021】次に、レーザスポットにより励起された試料面12の蛍光分子から発せられた異なる2つの波長の蛍光は、対物レンズ11、瞳投影レンズ10、スキャナ光学系7、スキャナミラー5、6を逆にたどって、それぞれの波長によりダイクロイックミラー3または4により反射され、コレクタレンズ13、16によってピンホール14、17上に集光され、ピンホール14、17を通過した蛍光だけが光検出器15、18で検出される。

【0022】本実施例では、スキャナ光学系7は、スキャナミラー5、6側から負レンズ群、正レンズ群からなるレトロフォーカスタイルの構成をしており、その倍率色収差は、対物光学系の倍率色収差を打ち消すように50 設計されているので（詳細後述）、試料面12から発せ

られてスキャナミラー5, 6に戻ってきた蛍光は、走査中においても入射時と同じ角度でスキャナミラー5から射出されることになる。従って、蛍光は、常にピンホール14, 17の同じ位置にスポットを結ぶことになる。

【0023】このため、倍率色収差に起因する視野周辺での光量の減少がなくなり、2つの異なる波長の蛍光の光量比較(図1中、検出器15と16でそれぞれ検出される光量の比較)によって行なう測定の定量性が確保される。

【0024】さて次に、図1の実施例における光学系の設計条件について、図3を参照して説明する。図3において、実線は物体結像を表わし、点線は瞳結像を表わしている。物体面(試料面)12の像は、対物レンズ11と瞳投影レンズ10によって1次像面9に結像され、対

$$r_{p1} = (f_1 / f_0) \cdot r_P = f_1$$

【0027】ここで、1次瞳面9でのスキャナミラー5, 6の有効半径を r_p とおくと、スキャナミラー5, 6によってビームがけられないようにするためにには、 $r_p \geq r_{p1}$ でなければならない。よって、式2から式3が導かれる。但し、 β_p は瞳倍率($= -f_1 / f_0$)である。

$$r_p \geq r_{p1} = f_1 \cdot f_0 \cdot NA / f_0 \quad \cdots \text{式2}$$

$$|\beta_p| = f_1 / f_0 \leq r_p / (f_0 \cdot NA) \quad \cdots \text{式3}$$

【0028】式3において、スキャナミラー5, 6の有効径 r_p には上限があり、特に機械的にミラーを振動させる場合には高速になる程有効径が小さくなるので、瞳倍率 β_p は式4を満たすように設定することが望ましい。

$$|\beta_p| \leq 1 \quad \cdots \text{式4}$$

【0029】また、実施例1のように、対物レンズ11の倍率色収差をスキャナ光学系7で補正するには、スキャナ光学系7を2群構成とすることが望ましい。スキャナ光学系7全体としては正のパワーをもつので、スキャナミラー5, 6側からみて正レンズ群-正レンズ群、正レンズ群-負レンズ群、負レンズ群-正レンズ群の3種類の構成が考えられる。このうち、正レンズ群-正レンズ群のものは全長が長くなってしまうという欠点がある。

【0030】更に、正レンズ群-負レンズ群、負レンズ群-正レンズ群の2つの構成について、同じ硝種を使って同じ条件で収差補正すると仮定してそれぞれの場合スキャナ光学系7のレンズを設計し、比較してみた。それぞれの場合のスキャナ光学系7の光路図(軸上周縁光線と最大像高の光線)を図5、図6に示す。図5はスキャナミラー5, 6側から負レンズ群($f = -37.5$)7a-正レンズ群($f = 53$)7bからなるレトロフォーカスタイル(逆望遠型)の構成であり、図6はスキャナミラー5, 6側から正レンズ群($f = 49.9$)7c、負レンズ群($f = -36.8$)7dからなるテレタイプ

物レンズ11の瞳P₁は、瞳投影レンズ10とスキャナ光学系7によってスキャナミラー5, 6の中間にある1次瞳面P₁に結像される。

【0025】一般に、蛍光は光量が少ないため、対物レンズ11の開口いっぱいに照明して、試料面12にできるだけ小さな励起光スポットを作り、更に、試料面12から出た蛍光を無駄なく利用できるように、図3に示されるように、対物レンズ11の瞳をスキャナミラー5, 6近傍にリレーする構成を取ることが望ましい。

【0026】このとき、1次瞳P₁の半径 r_{p1} は、式1で表わされる。但し、対物レンズ11瞳半径を r_{p0} 、スキャナ光学系7の焦点距離を f_1 、瞳投影レンズ10の焦点距離を f_0 、対物レンズ11の焦点距離を f_1 、対物レンズ11の物体側開口数をNAとする。

$$r_{p1} = f_1 \cdot NA / f_0 \quad \cdots \text{式1}$$

(望遠型)の構成であり、倍率色収差はどちらも同じ程度に補正されている。なお、図中9は、図1の1次像面9に対応する。

【0031】図5、6を比較すると明らかのように、テレタイプの構成(図6)では、スキャナミラーからのビームを最初の正レンズ群で強く内側に曲げ、次の負レンズ群で強く外側に曲げるという無理のある構成となっている。このため、図6のテレタイプの構成では、倍率色収差以外の収差は、図5のレトロフォーカスタイルの構成に比べて悪くなっている。また、テレタイプのものはレトロフォーカスタイルのものに比べて、光学系全体での外径が大きくなってしまっており、正レンズ群7cの厚さも厚くなっていることがわかる。従って、スキャナ光学系7

としては、ビームが自然な光路をとり、光学系全体がコンパクトになるレトロフォーカスタイルの構成をとることが好ましい。

【0032】次に、図2は本発明第2実施例による蛍光コンフォーカル顕微鏡の構成を示す光路図である。本実施例では、励起光1波長、蛍光2波長の蛍光波長により試料を染色して観察する場合の光学系において、リレー光学系で対物光学系の倍率色収差を補正する例について説明する。なお、レーザ光源、エクスパンダ、ダイクロイックミラー、スキャナミラー、コレクタレンズ、ピンホール、光検出器の配置は図1の場合と同じであるので、図2ではスキャナミラー25, 26と試料面32との間の構成だけを示す。

【0033】図2において、スキャナミラー25, 26より射出された励起光は、それ自体の倍率色収差が良く補正されたスキャナレンズ27によって集光され、2次像面29bにスポットを結ぶ。2次像面29bを通過した励起光は、リレー光学系33に入射し、ミラー28で折り曲げられて1次像面29aに再結像する。1次像面29aを通過した励起光は、瞳投影レンズ30及び対物レンズ31によって集光され、試料面32上にスポット

を結ぶ。このとき、実施例1と同様に、スキャナミラー25, 26を振ることにより、励起光スポットで試料面32が2次元走査される。なお、図中ミラー28は、光学系を倒立型の配置にするためのものであり、必ずしも必要なものではない。

【0034】次に、励起光スポットにより励起された試料面32の蛍光分子から発せられた異なる2つの波長の蛍光は、対物レンズ31、瞳投影レンズ30、リレー光学系33、スキャナミラー25, 26を逆にたどり、図1の場合と同様に、ダイクロイックミラーで反射され、コレクタレンズによってピンホール上に集光され、光検出器で検出される。

【0035】本実施例では、リレー光学系33の倍率色収差は、対物レンズ11の倍率色収差を打ち消すように設計されており（詳細後述）、試料面32から発せられてスキャナミラー25, 26に戻ってきた蛍光は、スキャナミラー5, 6の動作中も、入射時と同じ角度でスキャナミラー5から射出されることになる。従って、蛍光は、常にピンホールの同じ位置にスポットを結ぶことになり、実施例1と同様に、倍率色収差に起因する視野周辺での光量の減少がなくなり、2つの異なる波長の蛍光の光量比較によって行なう測定の定量性が確保される。

【0036】図2のように、試料面32の像をリレーする構成をとり、リレー光学系33によって対物光学系の倍率色収差を補正する場合、図1に比べて光路が長くなるが、光学系の設計の自由度は高くなる。図2の場合、リレー光学系33の倍率を適当な縮小倍率に設定することによって（詳細後述）、対物光学系の倍率収差を打ち消すような倍率色収差をリレー光学系33にもたせることが容易にできる。

$$r_{p2} \geq r_{p1} = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot NA / (f_1 + f_2) \quad \cdots \text{式6}$$

$$|\beta| = f_1 / f_2 \geq f_3 \cdot f_4 \cdot NA / (f_2 + f_3) \quad \cdots \text{式7}$$

【0040】式7において、スキャナミラー25, 26の有効径 r_p には上限があり、また、スキャナレンズ27の焦点距離 f_4 をあまり短くすると、2次瞳面 P_2 近傍に配置されるスキャナミラー25, 26とスキャナレンズ27が干渉するので（ミラーが回転するときにレンズにぶつかる）、リレー光学系33の倍率 β は式7で

$$f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot NA / (f_1 + r_p) \leq |\beta| < 1 \quad \cdots \text{式8}$$

【0042】なお、上記の実施例では、励起光1波長、蛍光2波長の蛍光試薬を用いる場合について説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、励起光1波長、蛍光1波長、あるいは励起2波長、蛍光1波長、その他の蛍光試薬を用いる場合にも適用できるものである。

【0043】また、実施例1ではスキャナ光学系によって、実施例2ではリレー光学系によってそれぞれ対物光学系の倍率色収差を補正しているが、スキャナ光学系とリレー光学系を組み合わせて対物光学系の倍率色収差を補正するようにしても良いことは言うまでもない。

【0037】次に、図2の実施例における光学系の設計条件について、図4を参照して説明する。図4において、実線は物体結像を表わし、点線は瞳結像を表わしている。物体面（試料面）32の像は、対物レンズ31と瞳投影レンズ30によって1次像面29aに結像され、更に、リレー光学系33によって2次像面29bに再結像される。また、対物レンズ31の瞳 P_1 は、瞳投影レンズ30とリレー光学系33の第1レンズ33aによって1次瞳面 P_1 に結像され、更に、リレー光学系33の第2レンズ33bとスキャナミラー27によってスキャナミラー25, 26の中間にある2次瞳面 P_2 に再結像される。

【0038】このとき、2次瞳 P_2 の半径 r_{p2} は、式5で表わされる。但し、スキャナレンズ27の焦点距離を f_1 、リレー光学系33の第1及び第2レンズ33a, 33bの焦点距離をそれぞれ f_2 , f_3 、瞳投影レンズ30の焦点距離を f_4 、対物レンズ31の焦点距離を f_5 、対物レンズ31の物体側開口数をNA、対物レンズ31の瞳半径を r_{p1} （= $f_5 \cdot NA$ ）、1次瞳半径を r_{p1} とする。

$$\begin{aligned} r_{p2} &= (f_1 / f_2) \cdot r_{p1} \\ &= (f_1 / f_2) \cdot (f_1 / f_3) \cdot r_{p1} \\ &= f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot NA / (f_2 \cdot f_3) \quad \cdots \text{式5} \end{aligned}$$

【0039】ここで、2次瞳面 P_2 でのスキャナミラー25, 26の有効半径 r_p とおくと、スキャナミラー25, 26によってビームがけられないようにするためには、 $r_p \geq r_{p2}$ でなければならない。よって、式6から式7が導かれる。但し、 β はリレー光学系の倍率（= $-f_1 / f_2$ ）である。

30

$$r_p \geq r_{p2} = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot NA / (f_1 + f_2) \quad \cdots \text{式6}$$

$$|\beta| = f_1 / f_2 \geq f_3 \cdot f_4 \cdot NA / (f_2 + f_3) \quad \cdots \text{式7}$$

表わされる下限が存在する。

【0041】また、対物光学系の倍率色収差をリレー光学系33で補正する場合のリレー光学系33の倍率は、 $|\beta| < 1$ であることが望ましい。故に、リレー光学系33の倍率 β は式8の条件を満たすことが望ましい。

40 【0044】

【発明の効果】以上のように、本発明においては、対物光学系と走査手段の間に設けられる中間光学系によって、対物光学系の励起光波長及び蛍光波長での倍率色収差を補正しているので、対物光学系と中間光学系の合成系全体として倍率色収差が低減される。このため、蛍光スポット中心とピンホール中心のずれが小さくなり、視野の広い範囲にわたって優れた光学的切断機能と良好な横方向分解能が得られる。また、試料の光軸方向の移動に対する検出光量の応答の形が理論値に近くなり、得られる画像の信頼性が向上する。更に、複数の波長の異なる

9

る励起光又は蛍光を使用する定量測定を行なう際に、視野の広い範囲に渡って測定の定量性を確保することができる。

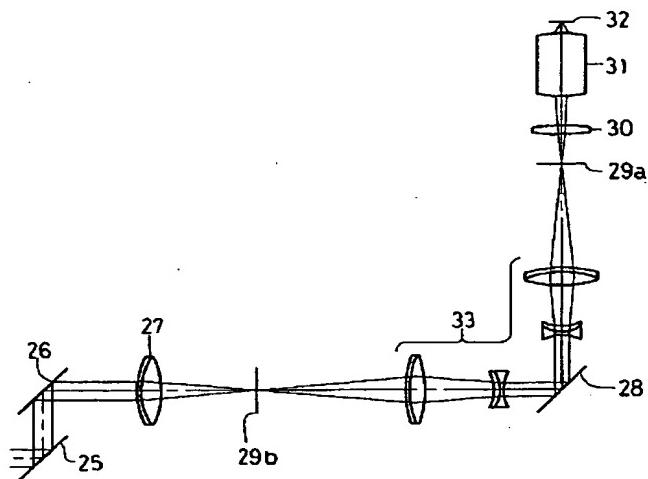
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明第1実施例による蛍光コンフォーカル顕微鏡の構成を示す光路図である。

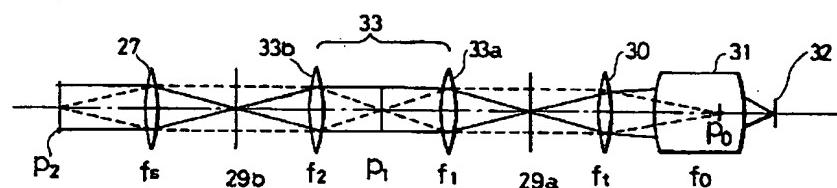
【図2】本発明第2実施例による蛍光コンフォーカル顕微鏡の構成を示す光路図である。

【図3】実施例1における望ましい設計条件を説明するための要部光路図である。

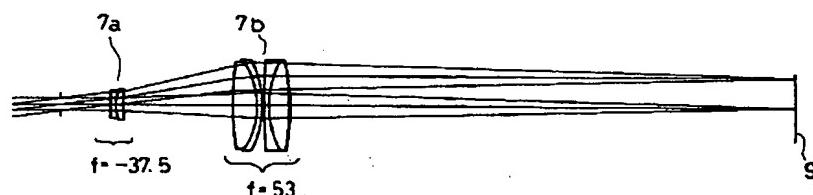
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

